Свободные радикалы. Образование и метаболизм

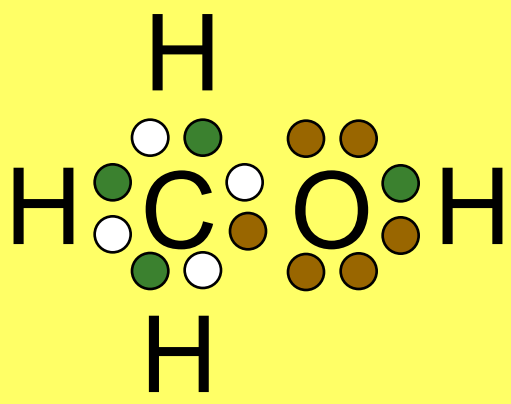
Ю.А. Владимиров

Медико-биологический факультет РГМУ

Факультет Фундаментальной Медицины МГУ

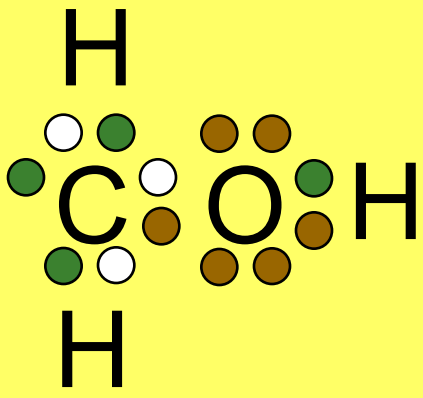
Что такое свободный радикал ?

Свободный радикал - это молекулярная частица, у которой на внешней оболочке имеется хотя бы один неспаренный электрон.



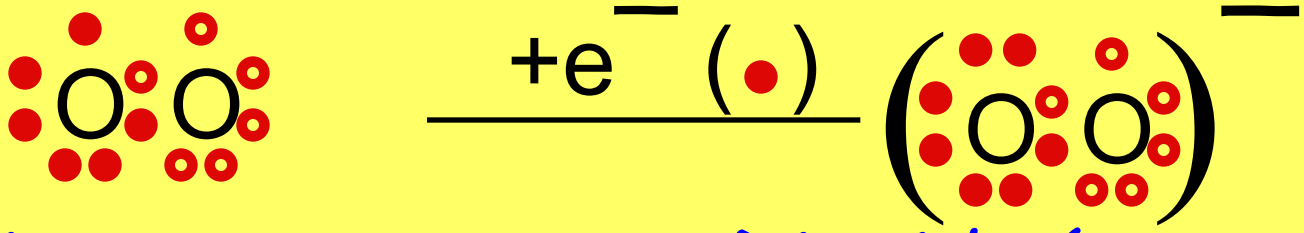
метанол

Радикал может образоваться из молекулы при ее окислении, например при отрыве атома водорода (т.е. электрона и протона)



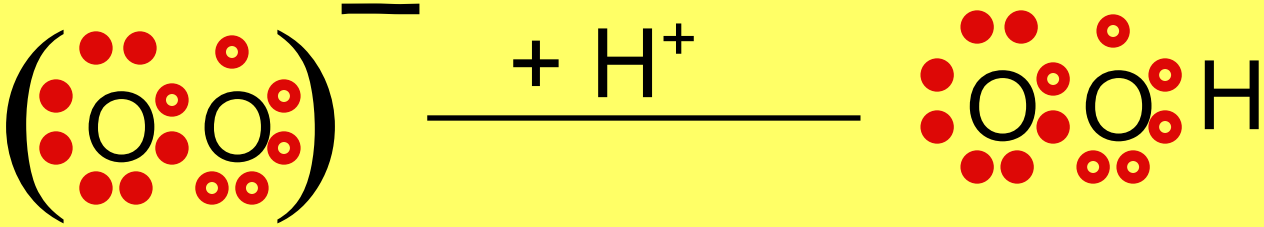
радикал метанола

Электронная структура некоторых радикалов



Dioxygen *Dioxide (superoxide)*

$$O_2 + e^- \rightarrow \cdot OO^-$$



Гидроперекисный радикал

$$\cdot OO^- + H^+ \rightarrow \cdot OOH$$

$$\cdot OOH + e^- + H^+ \rightarrow HOOH$$

Гидропероксид водорода

Методы изучения реакций с участием свободных радикалов

Биохимические

Маркеры
Диеновая коньюгация
Ингибиторный анализ

Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР)

Прямое обнаружение радикалов
Метод спиновых ловушек

Хемилюминесценция

Собственная
Активированная

Липидные системы

Клеточная ХЛ

Липопротеины крови

Действие лазеров

АОА веществ

Диагностика

Хемилюминесценция при цепном (перекисном) окислении липидов

Цепное окисление липидов

Цепному окислению подвергаются жирные кислоты, углеводородные цепи которых содержат двойные связи. Окисление начинается с отрыва атома водорода в метиленовой группе рядом с двойной связью:

— **CH_2** — CH = CH —

Обозначим эту группу как **LH**.

Инициирование цепи

$$HO^{\bullet} + LH \rightarrow L^{\bullet} + HOH$$

$$L^{\bullet} + OO \rightarrow LOO^{\bullet}$$

Звено цепи

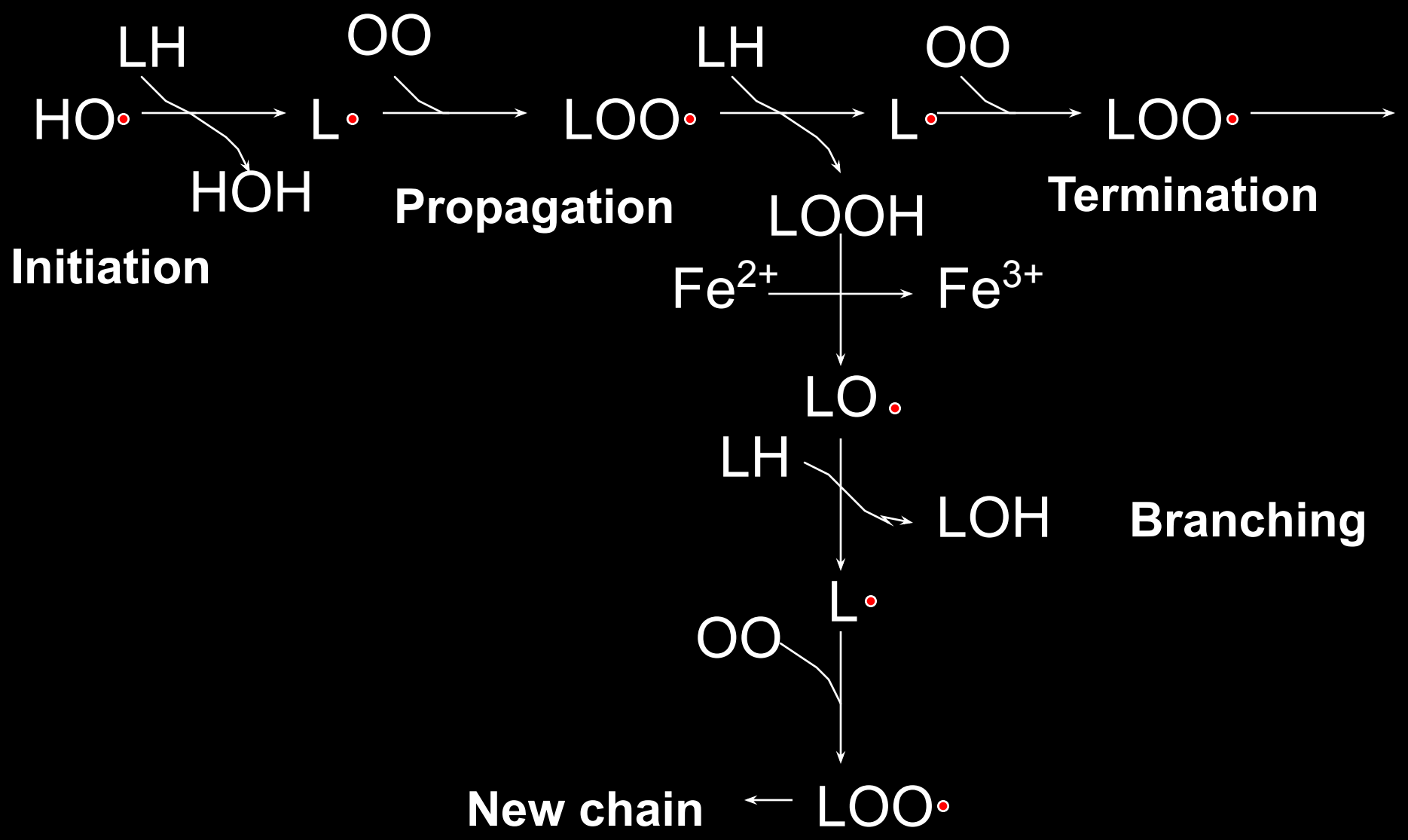
Продолжение цепи

$$LOO^{\bullet} + LH \rightarrow L^{\bullet} + LOOH$$

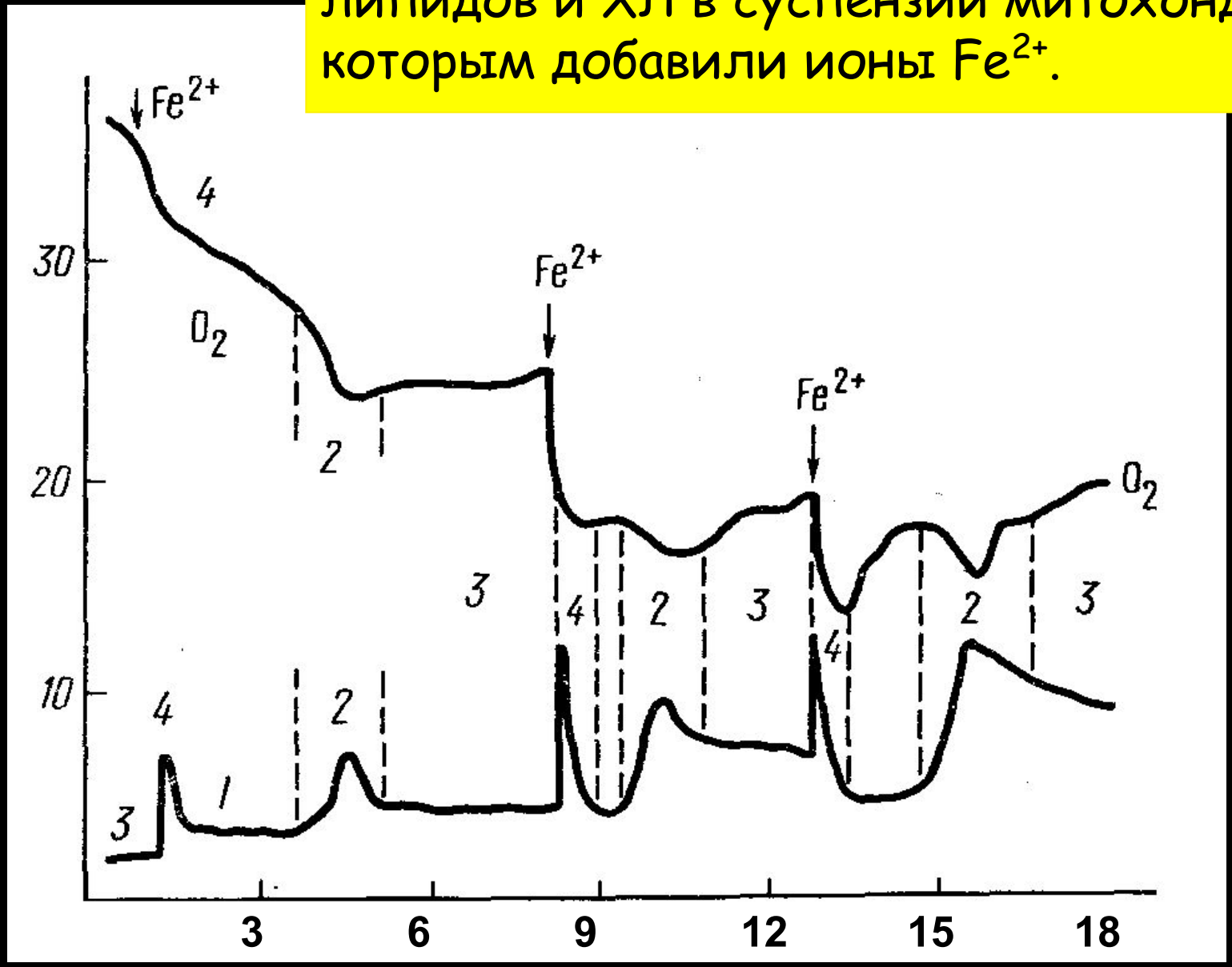
$$L^{\bullet} + OO \rightarrow LOO^{\bullet} \rightarrow$$

$$\rightarrow LOO^{\bullet} + InH \rightarrow LOOH + In^{\bullet} \rightarrow$$ Обрыв цепи

Реакции цепного окисления липидов



Корреляция между цепным окислением липидов и ХЛ в суспензии митохондрий к которым добавили ионы Fe^{2+}.



ХЛ и [O_2] (отн. ед.)

Время инкубации, мин

Корреляция между образованием продукта пероксидации (МДА) и ХЛ в суспензии митохондрий.

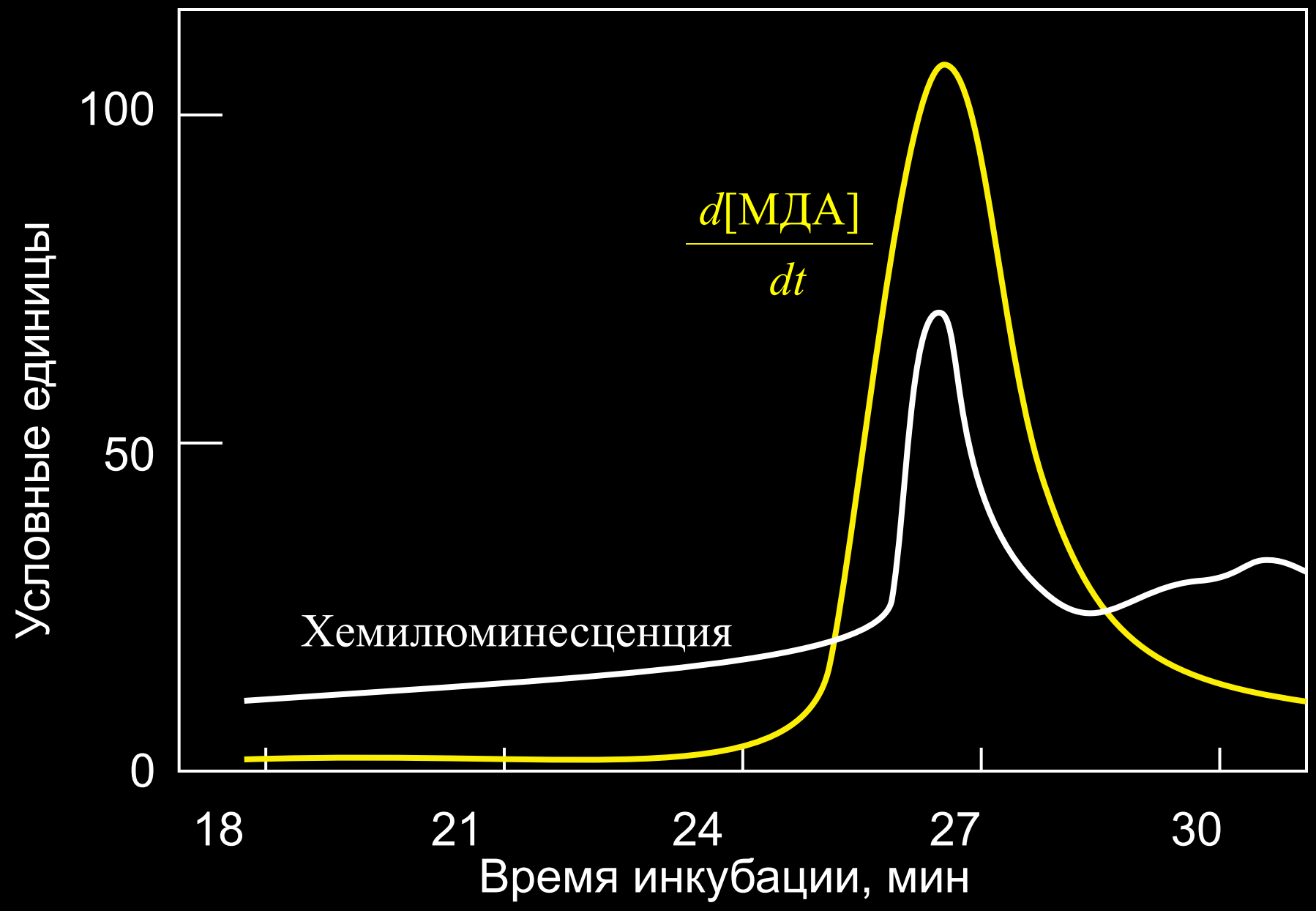
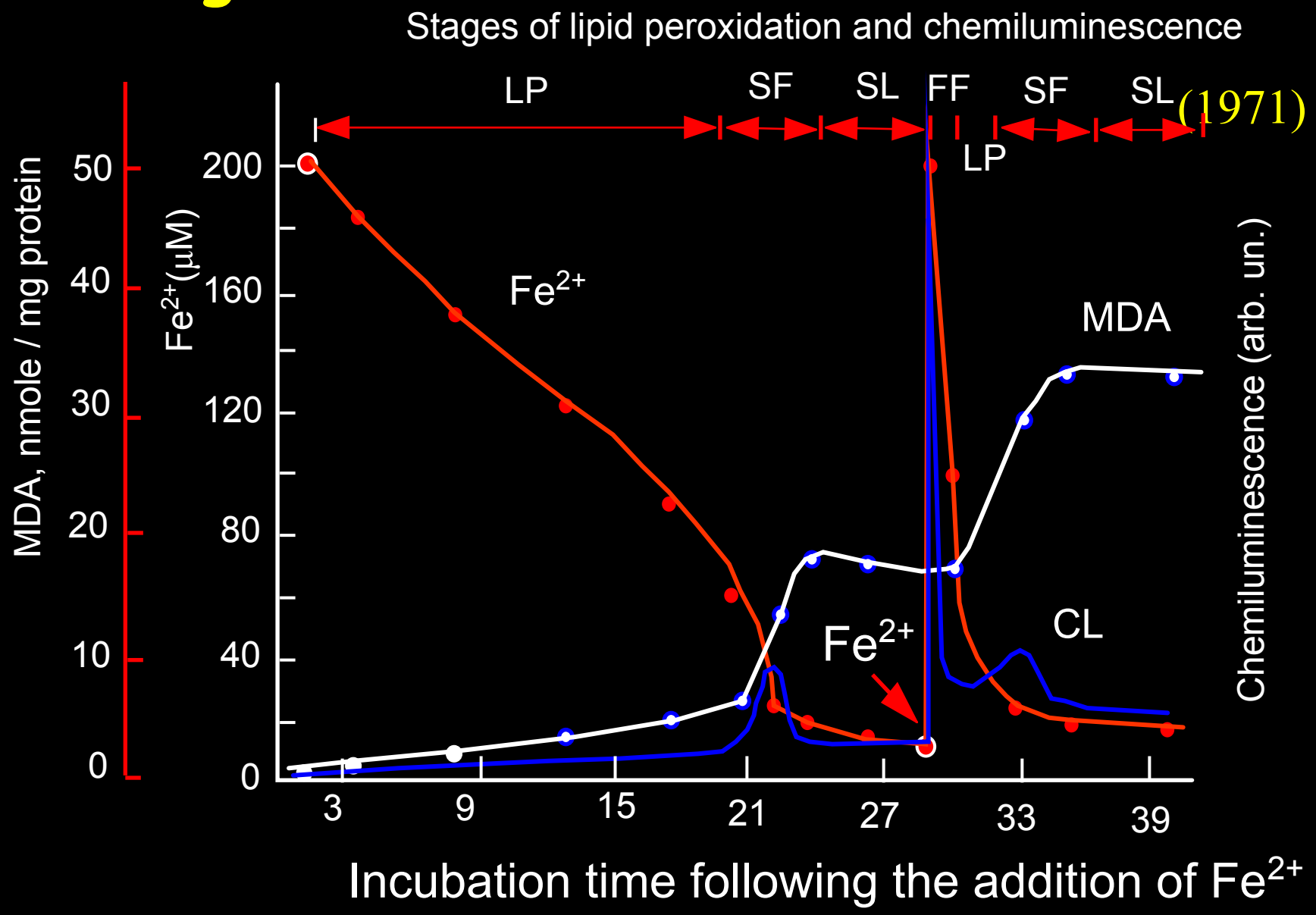


Fig. 8


Stages of lipid peroxidation and chemiluminescence
LP
SF
SL
FF
SF
SL
(1971)
LP
MDA, nmole / mg protein
50
40
30
20
10
0
Fe^{2+}(μM)
200
160
120
80
40
0
Fe^{2+}
MDA
CL
Fe^{2+}
Chemiluminescence (arb. un.)
3
9
15
21
27
33
39
Incubation time following the addition of Fe^{2+}

Реакции, ответственные за хемилюминесценцию

В вакуме:

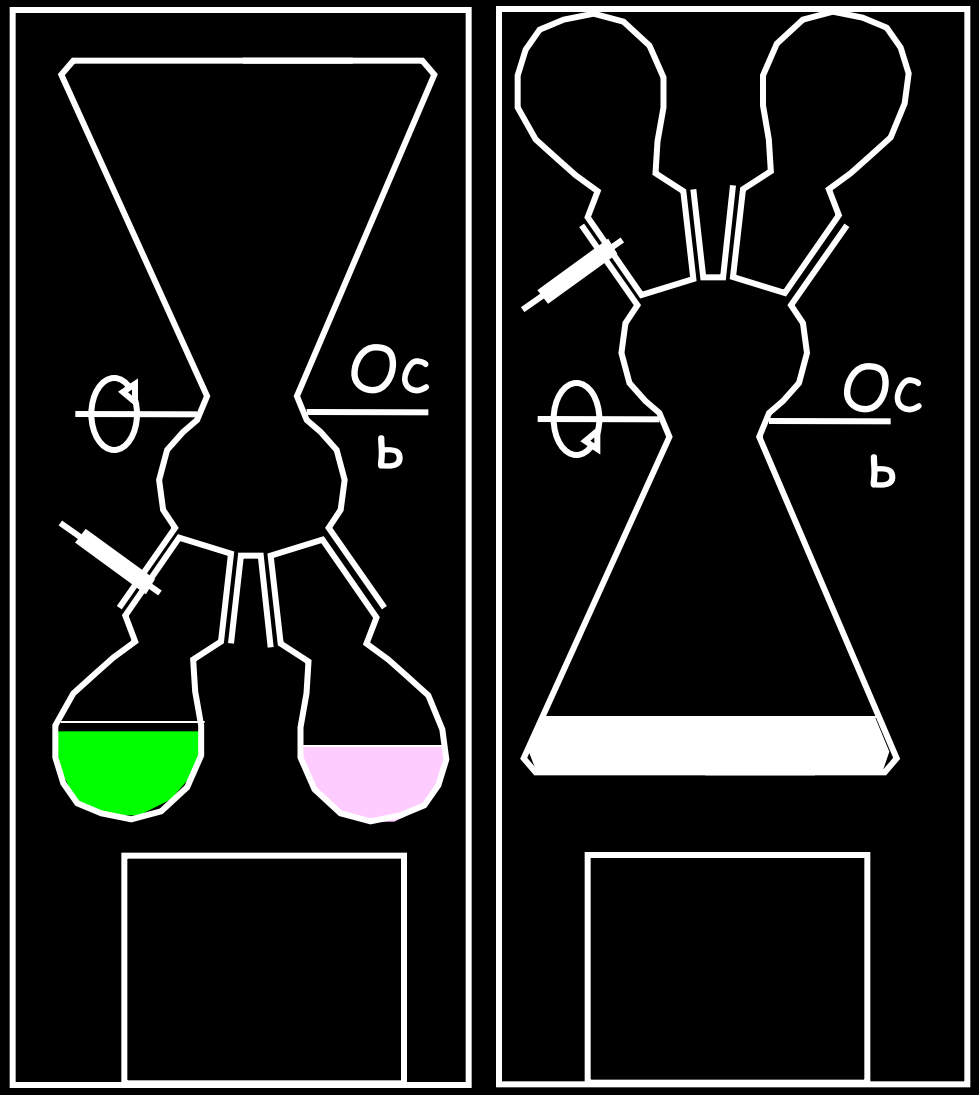
$$Fe^{2+} + LOOH \rightarrow LO\bullet + Fe^{3+}$$
$$LO\bullet + LH \rightarrow LOH + L\bullet$$

На воздухе:

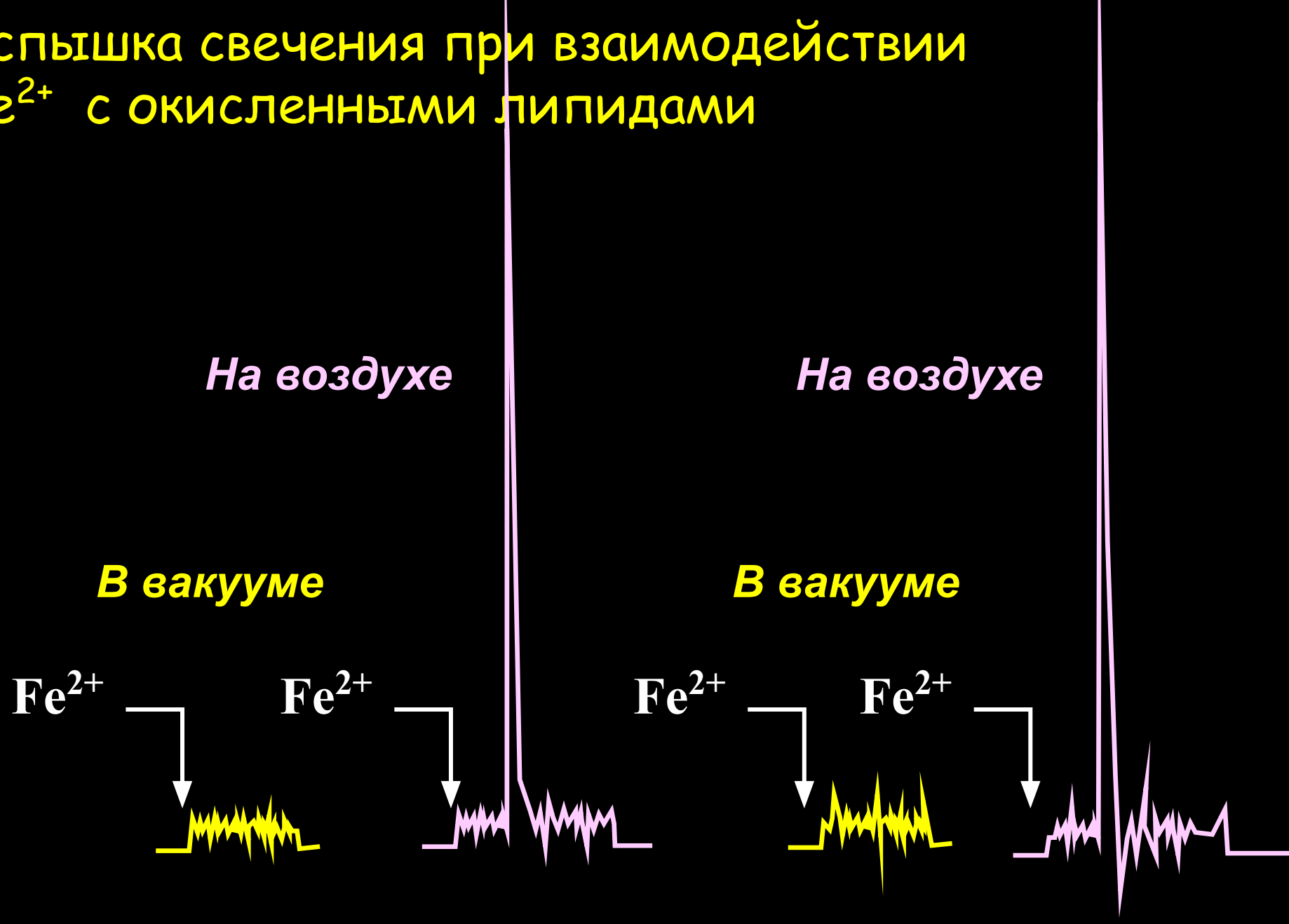
$$L\bullet + O_2 \rightarrow LOO\bullet$$
$$LOO\bullet + LOO\bullet \rightarrow$$
$$\rightarrow L{=}O + LOH$$

Fe^{2+}

LOOH



Вспышка свечения при взаимодействии Fe^{2+} с окисленными липидами



Олеиновая кислота

Митохондрии

Измерение ХЛ – прямой метод определения радикалов LOO· в биохимических системах

$$LOO^{\cdot} + LOO^{\cdot} \rightarrow LOH + L{=}O^{*} + {}^{1}O_{2}$$

$$L{=}O^{*} \rightarrow L{=}O + \text{фотон}$$

$${}^{1}O_{2} \rightarrow {}^{3}O_{2} + \text{фотон}$$

<u>Недостатки ХЛ метода:</u>

1. Свечение очень слабое.
2. Свечение неспецифическое.

<u>В результате:</u>

Неизвестно, измеряем ли мы нужные нам процессы или же побочные реакции.

Хемилюминесценция при образовании активных форм кислорода

Основоположники

Robert Allan. Открыл ХЛ нейтрофилов в 1971 году.

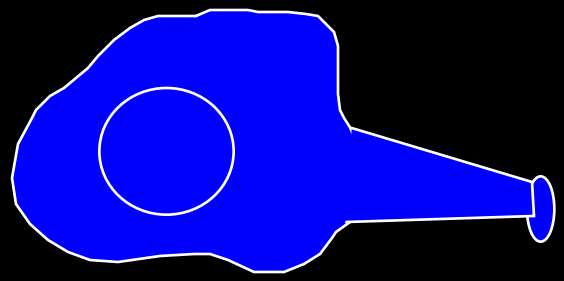
Юрий Владимиров (1959). Сверхслабое свечение животных тканей.

A.U. Khan. Открыл ХЛ при реакции гипохлорита с H_2O_2 в 1970 г.

Берлин 1997

Супероксидный радикал

Основной источник супероксидных радикалов в нашем организме - клетки-фагоциты, к которым относятся гранулоциты и моноциты крови, и тканевые макрофаги.



Фагоцит

Встретив чужеродную частицу, например, бактерию, фагоцит прикрепляется к ней и начинает выделять активные формы кислорода, первая из которых - супероксидный радикал.

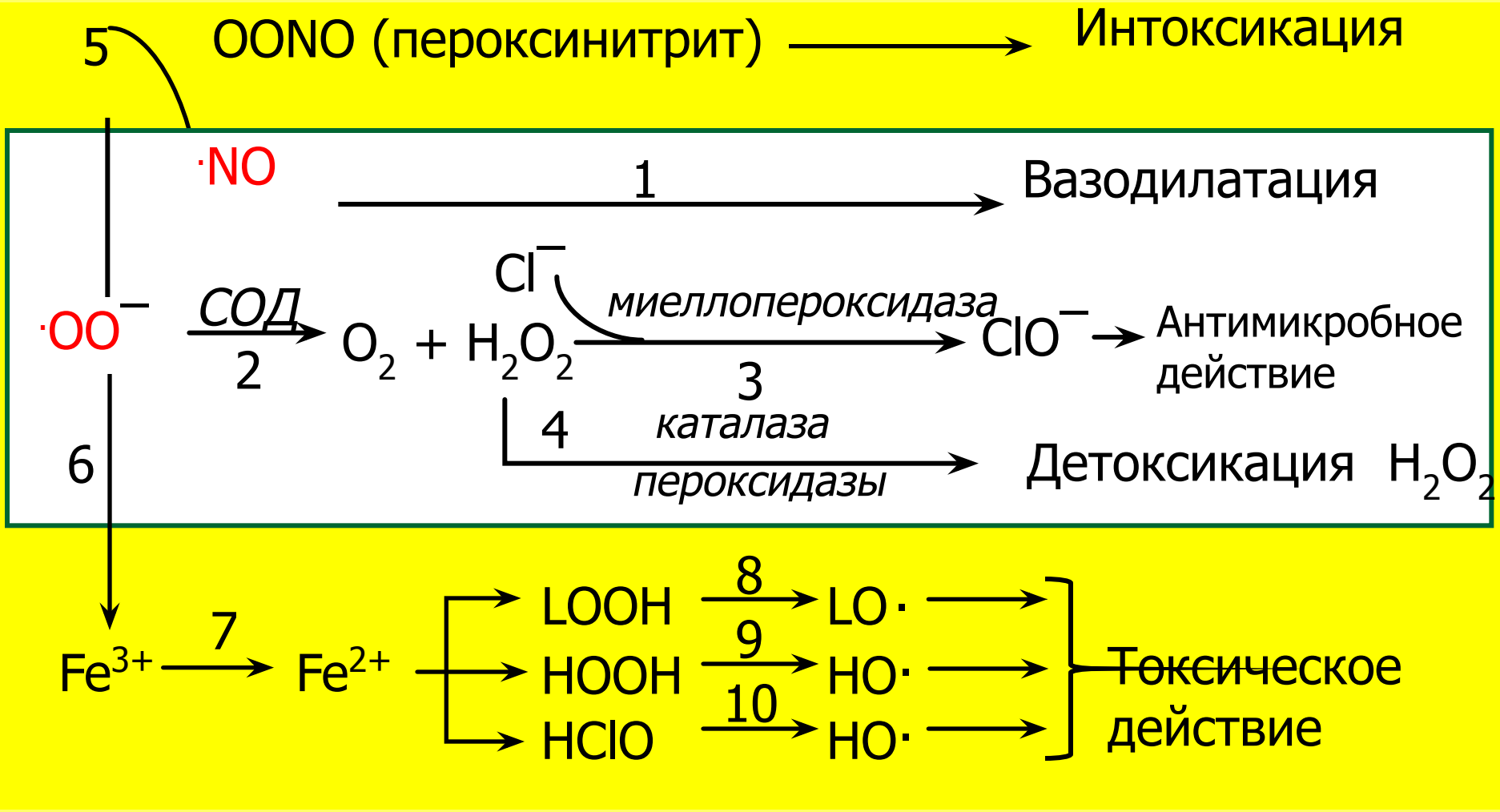
$$\text{НАДФН} + 2O_2 \rightarrow \text{НАДФ}^+ + 2(\bullet O_2^-)$$

Реакция катализируется ферментным комплексом —НАДФН оксидазой, который встроен в цитоплазматическую мембрану.

Метаболизм супероксидного радикала

1) $2\ {\cdot}OO^{-} \rightarrow H_2O_2 + {}^3O_2$
(*Супероксиддисмутаза*)
2) $2\ {\cdot}OO^{-} \rightarrow H_2O_2 + {}^1O_2$ (*Спонтанно*)
3) ${}^1O_2 \rightarrow {}^3O_2 +$ **фотон (1268 нм)**
4) $H_2O_2 \rightarrow H_2O + ½O_2$ (*Каталаза*)
5) $H_2O_2 + Cl^{-} \rightarrow H_2O + ClO^{-}$
(*Миелопероксидаза*)
6) $H_2O_2 + {\cdot}OO^{-} + H^{+} \rightarrow H_2O + {\cdot}OH + {}^1O_2$
(*Реакция Габер-Вейса*)
7) $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO^{-} + Fe^{3+} + {\cdot}OH$
(*Реакция Фентона*)
8) $ClO^{-} + Fe^{2+} \rightarrow Cl^{-} + Fe^{3+} + {\cdot}OH$
(*Реакция Осипова*)

Судьба супероксидного радикала и нитроксида



Хемилюминесценция через стадию образования эксимеров кислорода

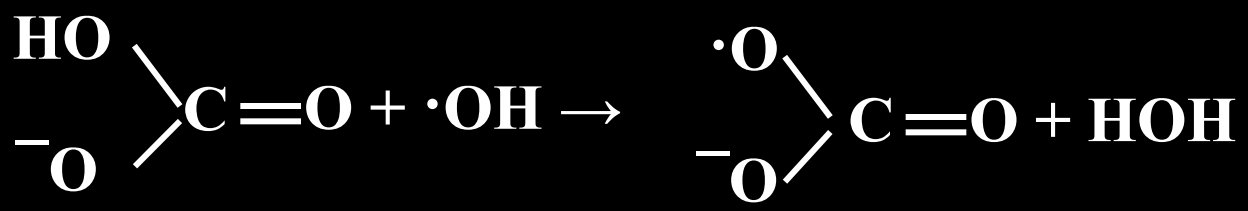
$$H_2O_2 + \cdot OO^- \rightarrow H_2O + \cdot OH + {}^1O_2$$

$${}^1O_2 \rightarrow {}^1O_2 + \text{фотон (1268 нм)};$$

$$O_2^1 + {}^3O_2 \rightarrow (O_2)_2^*$$

$$(O_2)_2^* \rightarrow 2O_2 + \text{фотон (480, 535 и 580 нм)}$$

Обзор: J. Stauff et al. in *Chemiluminescence and Bioluminescence* (M. Cormier et al., eds), 131-140 Plenum, NY, 1973.



$$2(\cdot CO_3^-) \rightarrow 2CO_2 + {}^1O_2 \rightarrow \text{свечение}$$

Гипотетическая схема

Активированная ХЛ

1. Химические активаторы (Sensitizers)

Два типа активаторов ХЛ - CL enhancers

Химические активаторы
– chemiluminogenic probes

Вступают в реакцию с образованием продуктов в эектронно-возбужденном состоянии.

Физические активаторы
– sensitizers

Не вступают в химические реакции, но увеличивают квантовый выход испускания фотона.

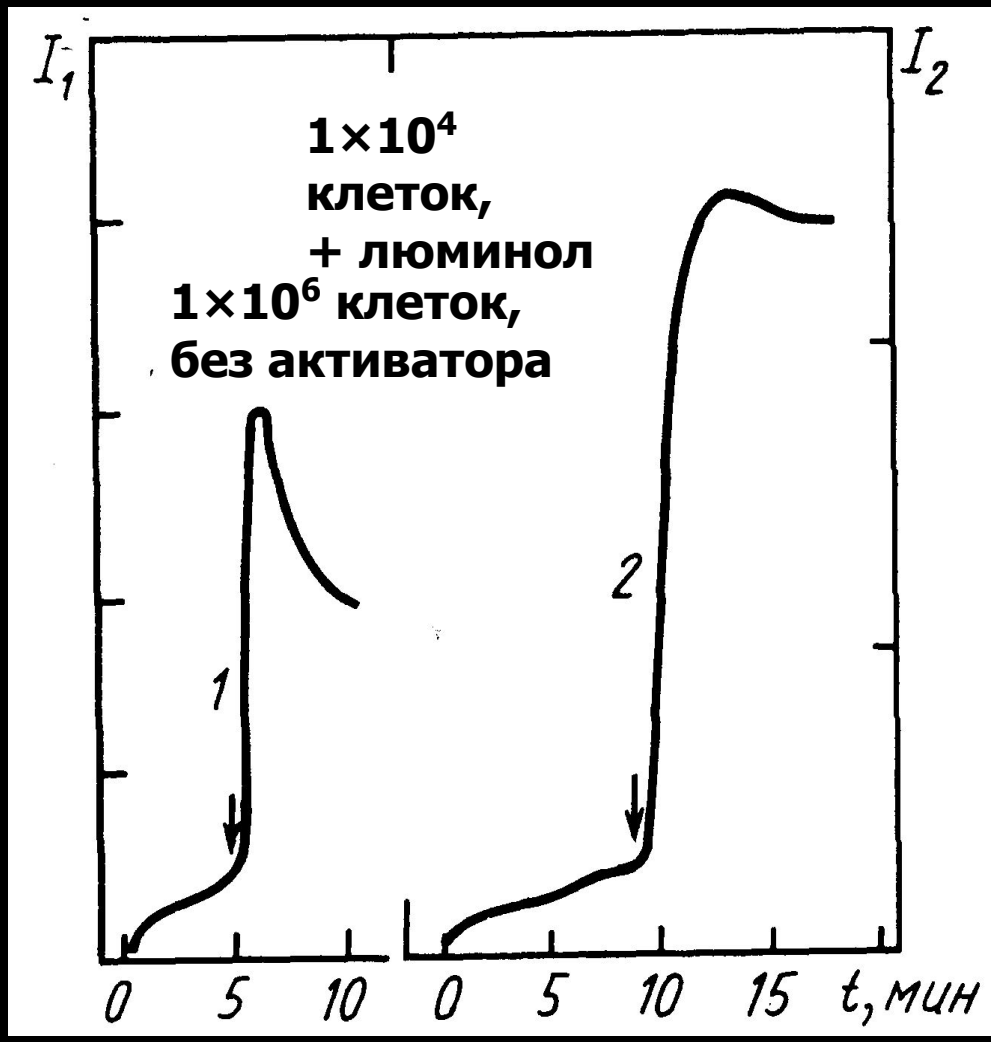
Активировированная ХЛ лейкоцитов

Люминол

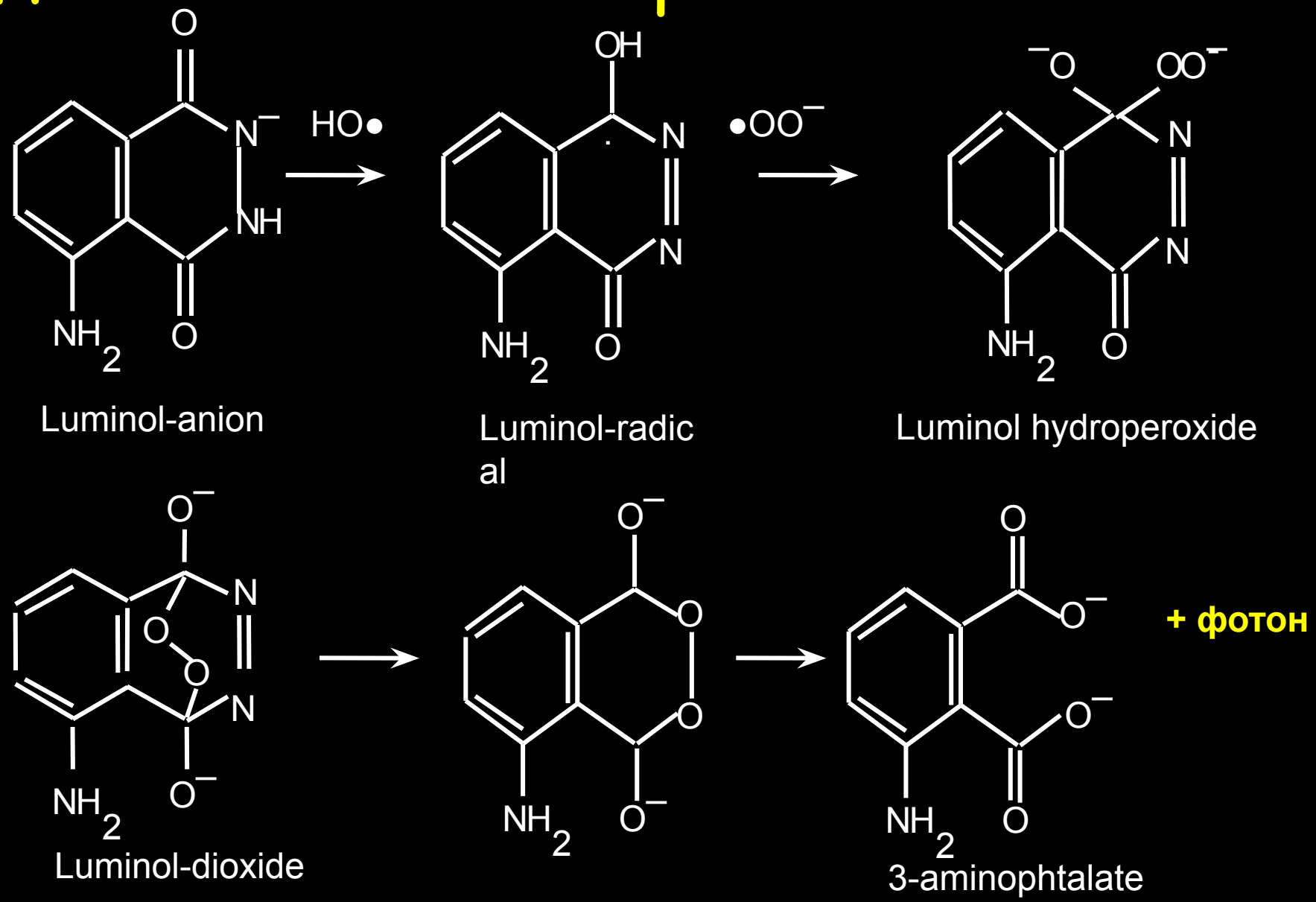
Вспышка ХЛ при добавлении стимула к нейтрофилам.
1- без активатора, 2 – с люминолом.

<u>Число клеток</u>: *1* = **1×10⁶**, *2* = **1×10⁴**.
<u>Чувтсвительность</u>: *1* = **×20**, *2* = **×1**.

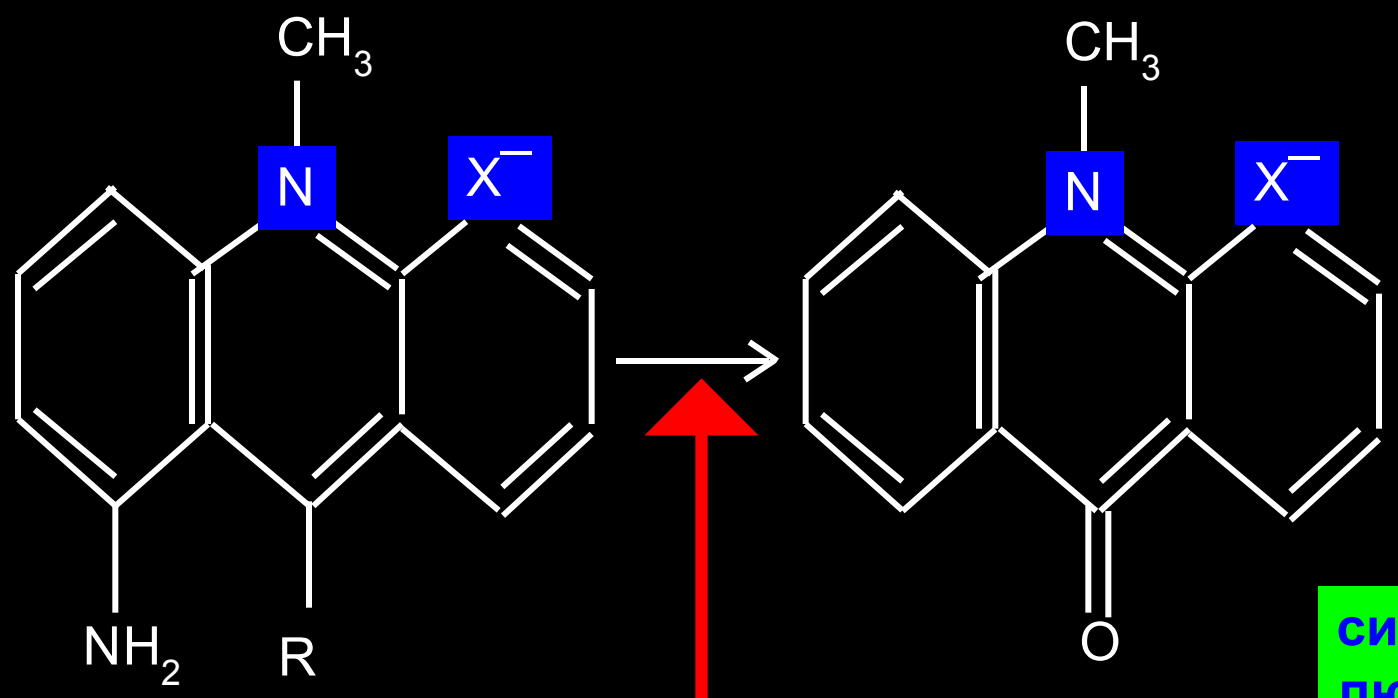
Yu. A. Vladimirov, S. R. Ribarov, P. G. Bochev, L. C. Benov, and G. I. Klebanov. *Gen. Physiol. Biophys.* **9** (1):45-54, 1990.



Люминол — реагент на гидроксил-радикал и гипохлорит.



Люцигенин — реагент на супероксид.



+ ROOH
или R=O

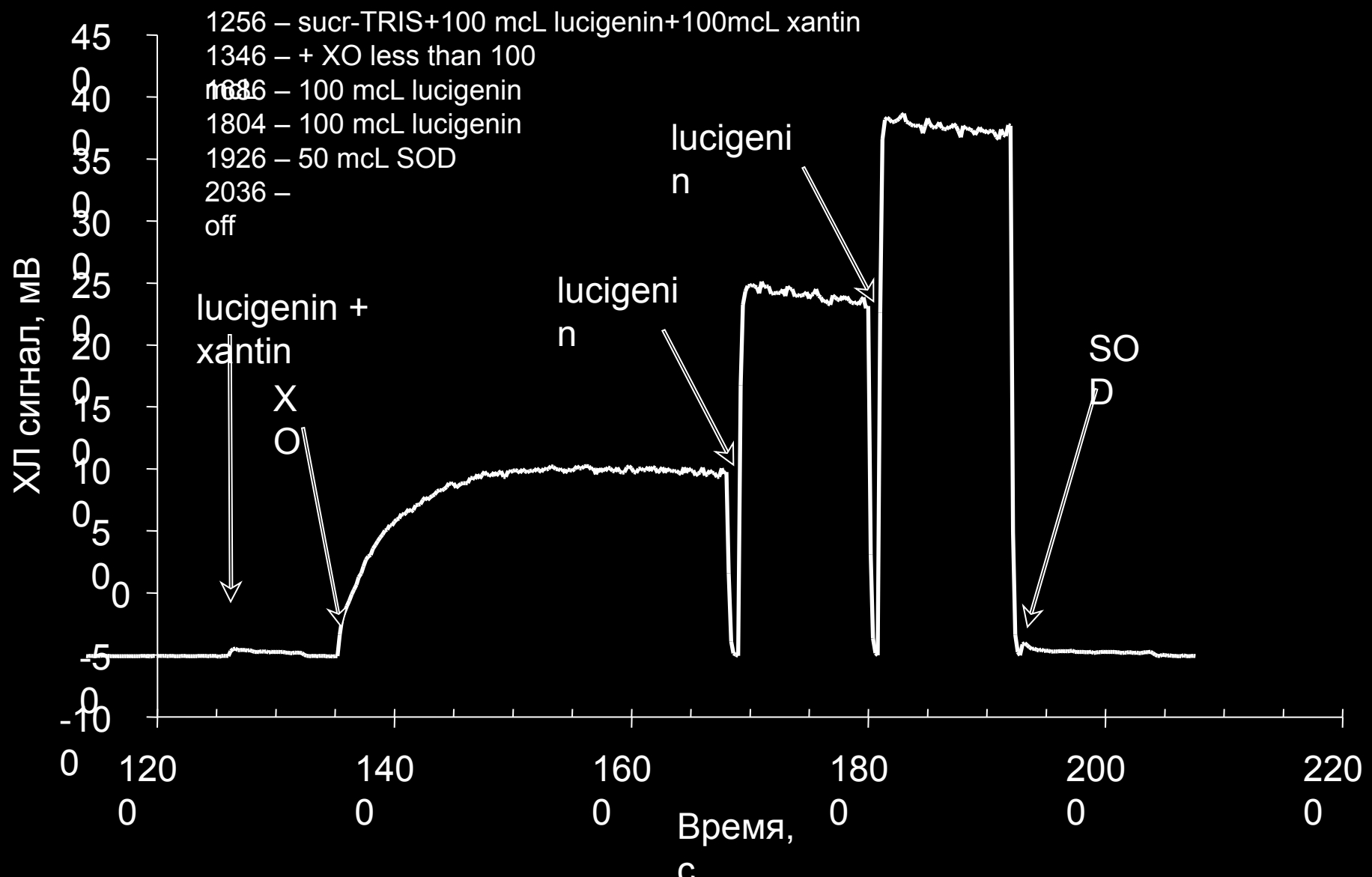
+ фотон

сине-зеленая люминесценция

люцигенин

+ HOOH в щелочной среде

Хемилюминесценция при окислении ксантина



Хемилюминесценция митохондрий

Место образования супероксида в митохондриях

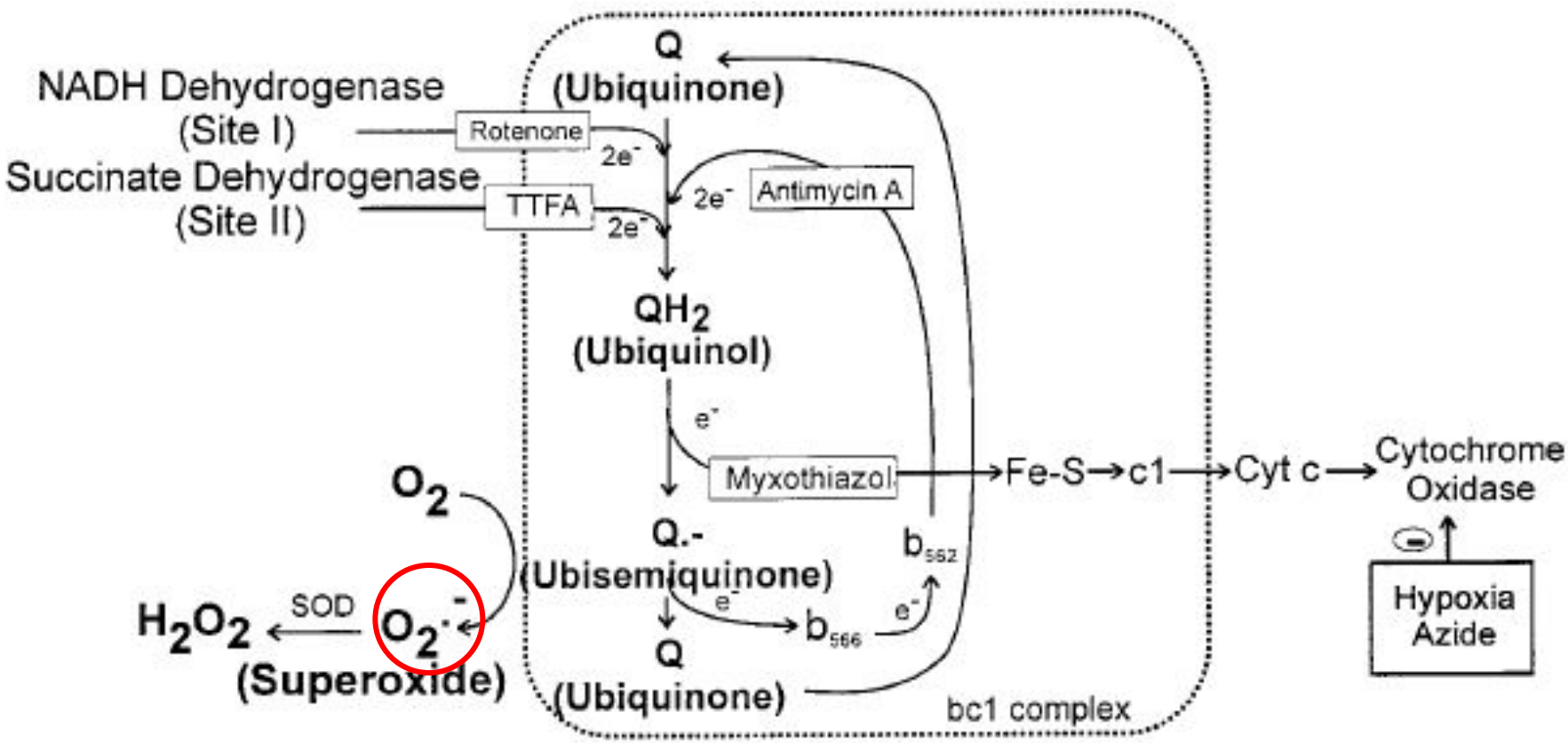


FIG. 8. **Scheme illustrating the effects of mitochondrial electron transport inhibition on superoxide generation. Sites of inhibition are indicated with *boxes*.**

J. Duranteau‡ N. S. C., A. Kulisz, Z. Shao, and P.T. Schumacker, *Intracellular Signaling by Reactive Oxygen Species during Hypoxia in Cardiomyocytes*, JBC, **273(**19):11619-11624 (1998).

Активированная ХЛ

2. Физические активаторы (Sensitizers)

Активированная ХЛ. Физические активаторы.

Квантовый выход ХЛ ($\eta_{ХЛ}$):

$$\eta_{хл} = \frac{\text{Число высвеченных фотонов}}{\text{Число прореагировавших молекул}}$$

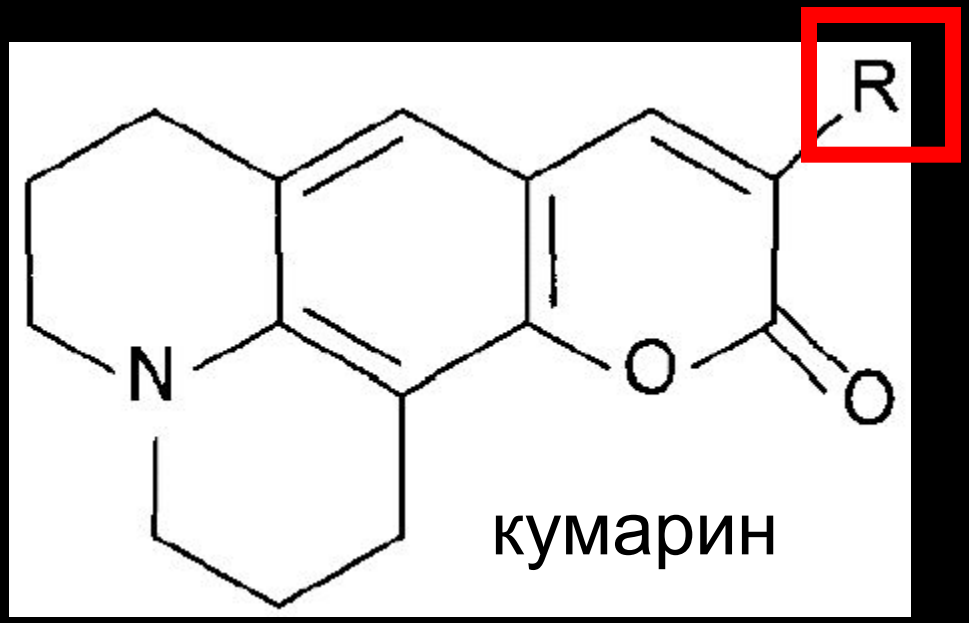
Многие химические реакции сопровождаются очень слабым свечением. Почему оно слабое?

$$\eta_{хл} = \eta_{воз} \cdot \eta_{люм} \approx 10^{-8}$$

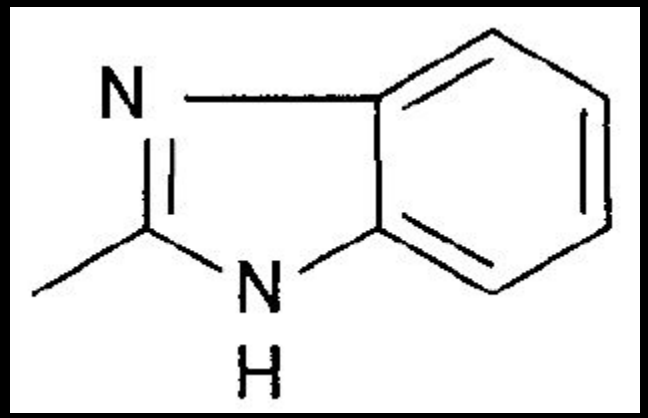
$$\eta_{воз} = \frac{\text{Число возбужденных молекул}}{\text{Число прореагировавших молекул}} \approx 10^{-4}$$

$$\eta_{люм} = \frac{\text{Число высвеченных квантов}}{\text{Число возбужденных молекул}} \approx 10^{-4}$$

Хинолизин кумарины — физические активаторы

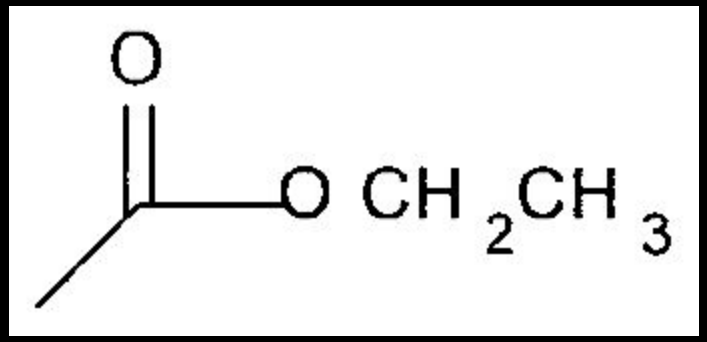


R =



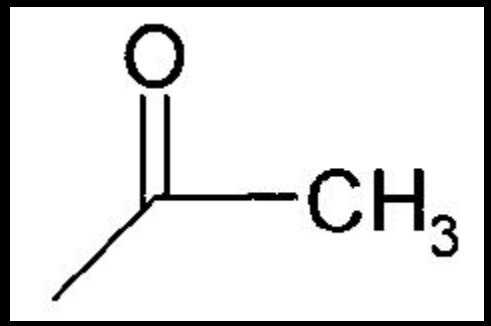
C-525

R =



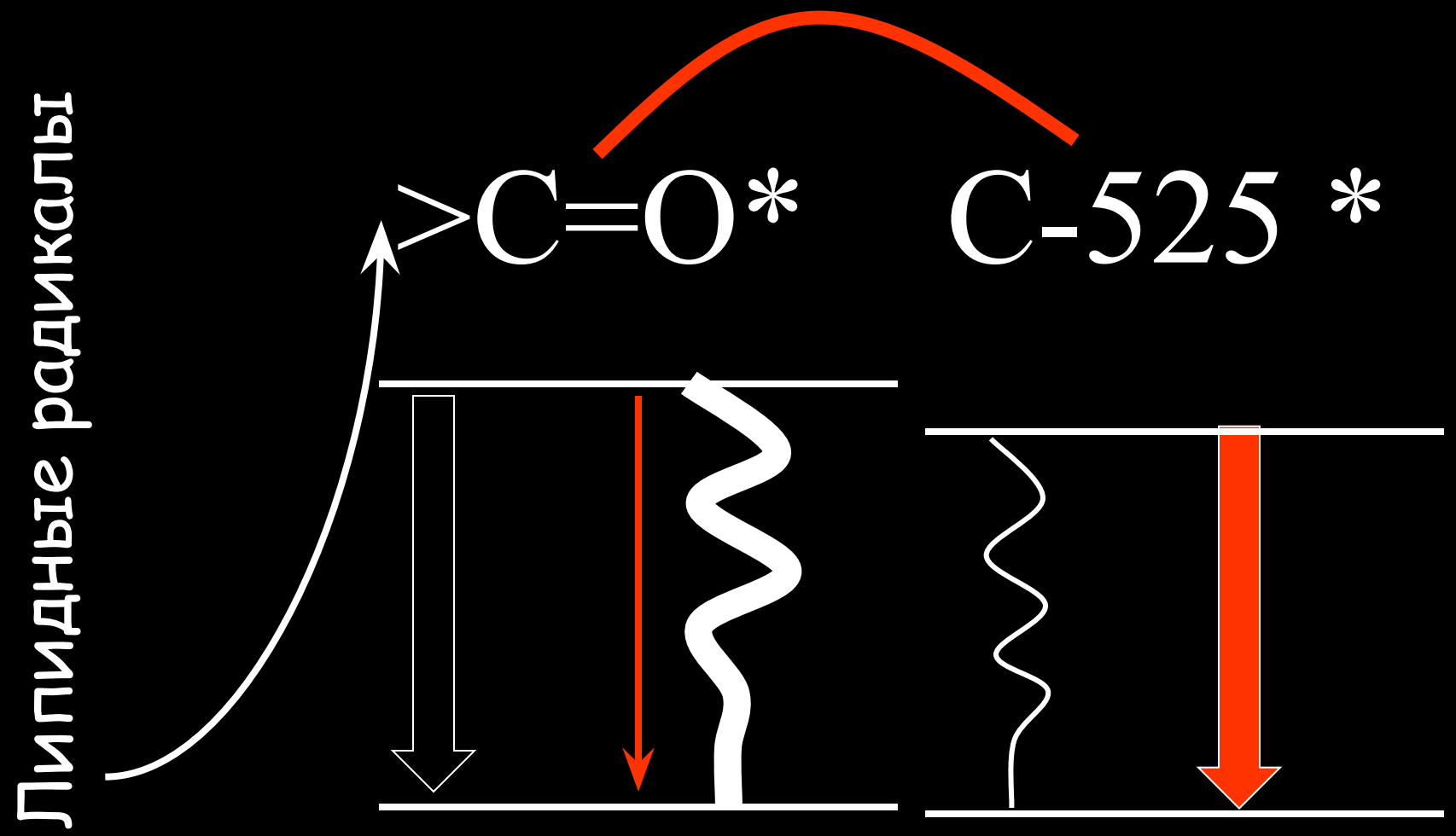
C-314

R =



C-334

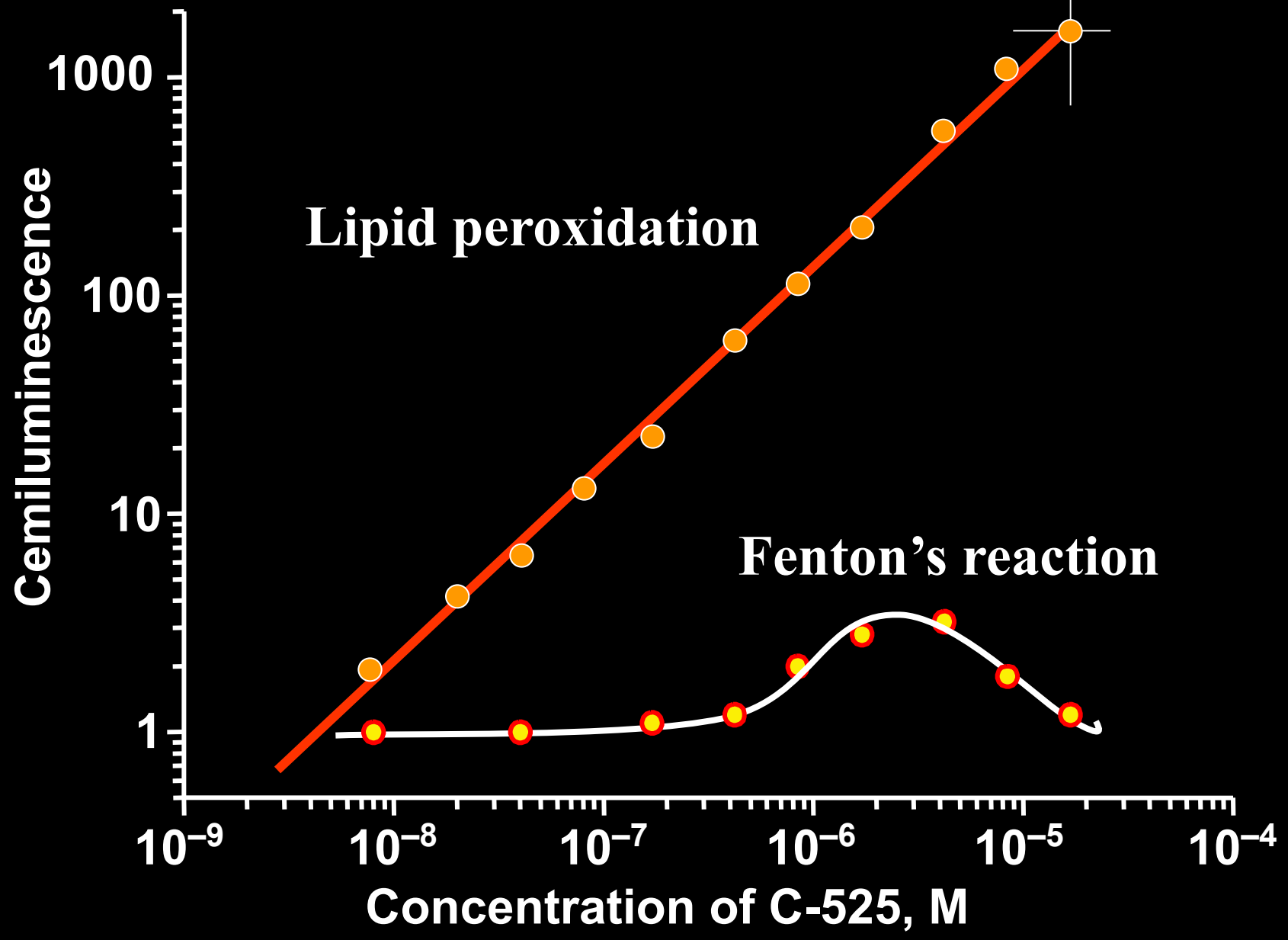
Механизм физической активации ХЛ



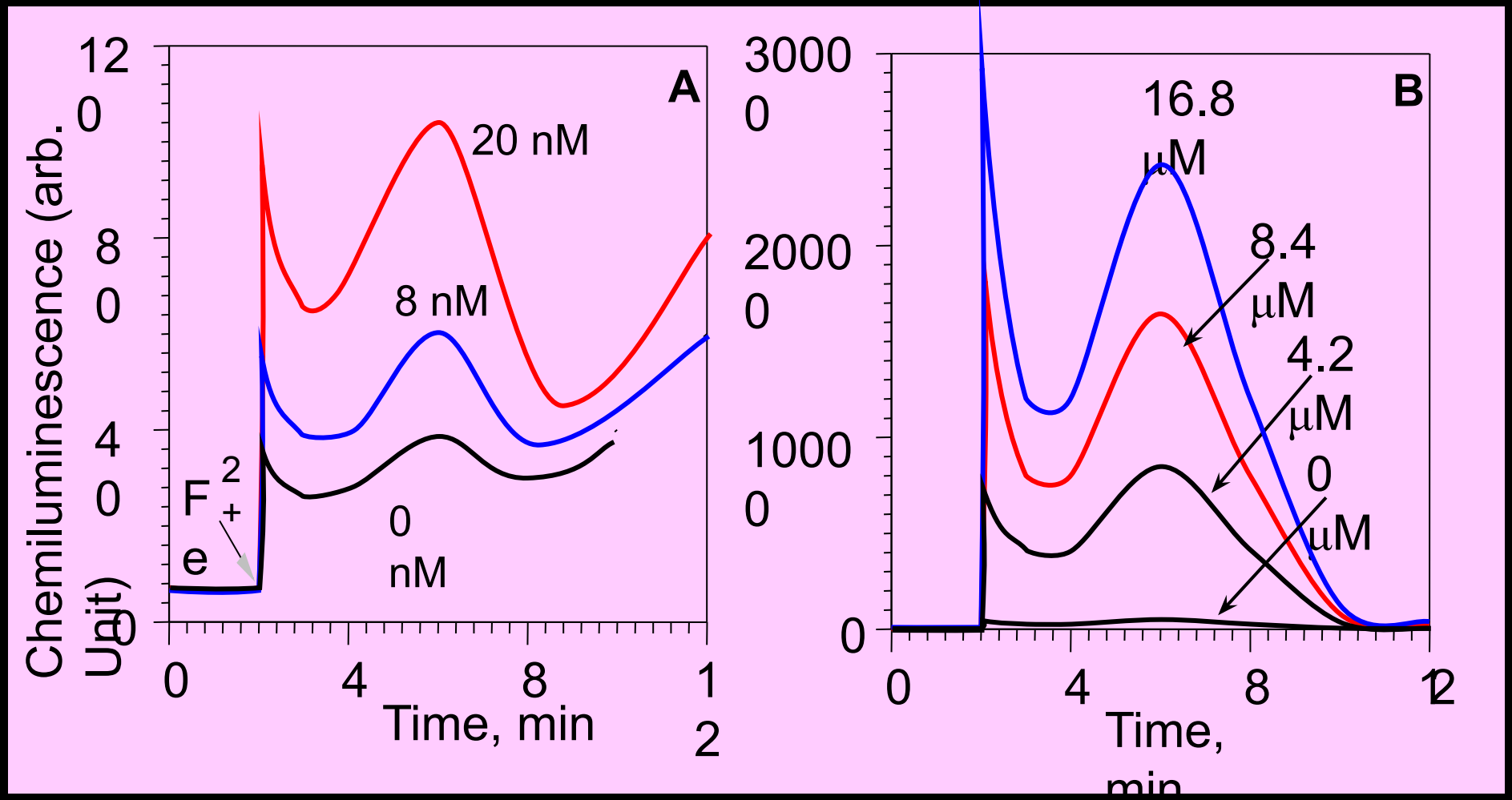
$\varphi = 10^{-4}$

$\varphi = 0.1 – 1.0$

Активация ХЛ кумарином С-525



Усиление ХЛ кумарином С-525.



Следующая презентация